文章编号:1000-5404(2012)19-1989-05

论著

新型动态加压交锁髓内针对骨折愈合的影响

罗 刚[1],刁鑫伟[2],李长青[1],周 跃[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:骨科[1],病理科[2])

[摘要] **目的** 探讨新型动态加压交锁髓内针影响骨折愈合的组织学及骨痂内Ⅰ型胶原和骨钙素的表达变化。**方法** 2周岁青山羊15只,制作双侧股骨干中段横断骨折模型,实验侧以新型动态加压交锁髓内针固定,旨在骨折断端形成持续性动态压应力条件,对照侧以普通髓内针固定。于术后第7、14、30、60、90天在骨折愈合处取材,行组织病理学和RT-PCR等检测。**结果** 组织学检测示实验组骨折间隙内软骨痂基质的钙化、软骨内成骨及编织骨的改建均快于对照组。RT-PCR检测示2组Ⅰ型胶原和骨钙素表达均在骨折术后上升,分别于术后14、30 d时相点达到峰值,实验组明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 新型动态加压交锁髓内针能够促进成骨细胞外基质的合成、分泌和软骨内成骨,从而有效加速骨折愈合过程。

[关键词] 交锁髓内针;骨折愈合;动态压应力;Ⅰ型胶原;骨钙素
[中图法分类号] R-332; R683.05; R687.33 [文献标志码] A

Effect of novel dynamic compressive interlocking intramedullary nail on fracture healing

Luo Gang[1], Diao Xinwei[2], Li Changqing[1], Zhou Yue[1] ([1]Department of Orthopedics, [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of novel dynamic compressive interlocking intramedullary nail on histology of fracture healing and expression of type Ⅰ collagen and osteocalcin in callus. **Methods** Fifteen 2-years-old goats were included in this study. A bilateral middle femoral shaft transverse fracture model was established. Its experimental side was internally fixed with dynamic compressive intramedullary nails to produce continuous dynamic compressive stress and its opposite side was fixed with ordinary intramedullary nails. Samples were taken from the healed fracture on days 7, 14, 30, 60 and 90, respectively, after operation. The fracture healing was assessed by histopathology and RT-PCR, respectively. **Results** Histology examination showed that the calcification of cartilage matrix in the fracture space and the reconstruction of osteogenesis and woven bone within the cartilage were faster in the experimental side than in the opposite side. RT-PCR displayed that the expression levels of type Ⅰ collagen and osteocalcin were higher after operation than before operation, reached their peak on days 14 and 30 after operation respectively, and were significantly higher in experimental group than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Novel dynamic compression intramedullary nail can effectively accelerate the healing of fractures by stimulating the bone extracellular matrix synthesis, secretion and formation of endochondrostosis.

[**Key words**] interlocking intramedullary nail; fracture healing; dynamic stress; type Ⅰ collagen; osteocalcin

Corresponding author: Zhou Yue, Tel: 86-23-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

骨组织具有自我愈合能力,骨折愈合是一个复杂的生物修复过程,受到多种内外因素的调节,最终重建损伤骨组织。研究证实,在骨折断端施加适当的微动应力能够促进骨痂生长,加速骨折愈合[1-2]。本单位根据多年临床经验结合骨折愈合生物力学特性设计了一款能够在骨折愈合过程中提供持续轴向压应力的交锁髓内针(autodynamic compressive locking nail, ACLN),本研究将其等比例缩小制成青山羊股骨干形态的髓内针,观察骨折间隙内骨形成组织学特点,检测成骨细胞相关因子Ⅰ型胶原和骨钙素(osteocalcin,

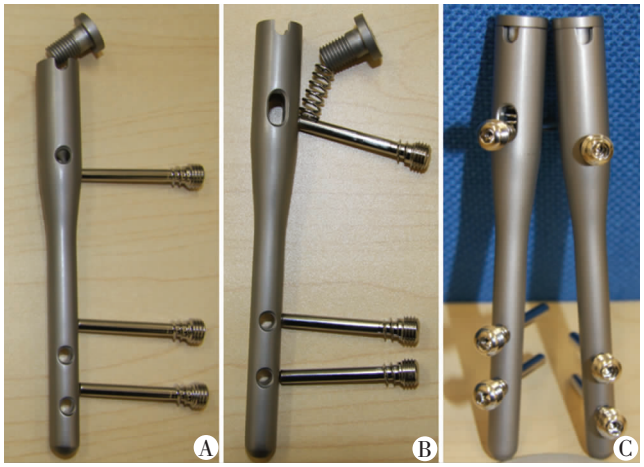
[通信作者] 周 跃,电话:(023)68755608,E-mail: happyzhou@vip.163.com

OC)表达变化与骨折愈合过程的关系,探讨在体持续动态轴向压应力环境对骨折愈合的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 动态加压 ACLN 的制作和作用原理

根据国家知识产权局授权本单位的"一种自动加压交锁髓内针"实用新型专利(ZL200920128291.7),按照实验羊的股骨尺寸等比缩小,参照 GB4234-2003,取医用钛合金材料 TC4 依据实验羊股骨干的解剖特征制作主钉,2 mm 厚,使用医用不锈钢 00Cr18Ni14Mo3 制作加压弹簧,弹簧中径为 5 mm,自由压缩行程 11 mm,最大压缩后可在骨折断端施加 140 N 的轴向压力,其余部件包括近端加压螺杆尾帽,远、近端交锁钉(图 1)。通过有限元建模和分析,在动态交锁髓内针安装时,主钉尾帽在旋入过程中可逐步压缩前端弹簧,并通过弹簧将应力传递到近端锁钉,进一步通过锁钉将力传递到骨质,最终达到骨折断端,并在骨折断端两侧形成对向压应力,可有效减少骨折愈合过程中断端间隙的距离(图 2、3)。同时,由于近端锁钉可在"肾形"凹槽内滑动,因此可在骨折愈合重建和改建过程中,随着肌肉的收缩或负重,使远近骨折断端向中线保持 1~5 mm 的轴向微动。这使得骨折端在整个骨折愈合过程中始终存在生理性应力刺激和传导,能够有效促进骨愈合。动物实验前,整套内固定器械消毒备用。



A:普通髓内针;B:自动加压交锁髓内针;C:安装完毕后两者对比

图 1 自动加压交锁髓内针与普通交锁髓内针外形比较

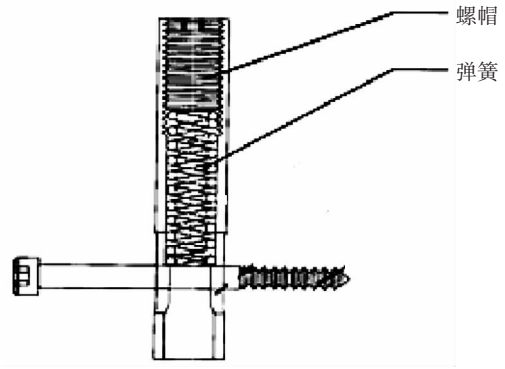
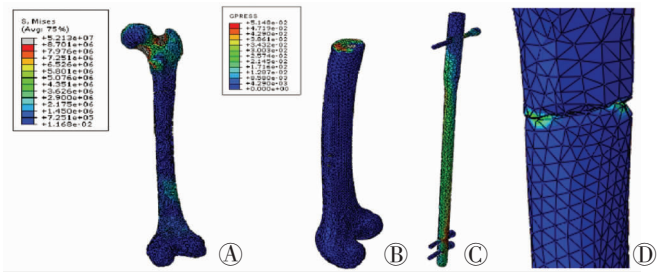


图 2 自动加压交锁髓内针加压结构剖面图



A:股骨颈的应力集中;B:骨折远端的应力集中;C:远端锁钉和主钉之间的应力集中;D:骨折断端间的应力集中

图 3 持续加压交锁髓内针安装完毕后有限元分析

1.2 实验动物模型制作和标本取材

取 2 周龄左右的青山羊 15 只,体质量 23~28 kg,双侧大腿做纵行切口,显露股骨骨干和股骨颈,用线锯于股骨中段横断截骨,建立双侧股骨干中段横断骨折模型。左侧(实验组)以 ACLN 固定(图 4),右侧(对照组)用普通髓内针固定。动物术后前 2 周悬吊饲养,后期正常喂养。分别于术后 7、14、30、60、90 d 随机选取 3 只青山羊取双侧骨折处内的骨痂留作标本,-70 ℃ 低温保存,动物尸体交实验室做无公害处理。

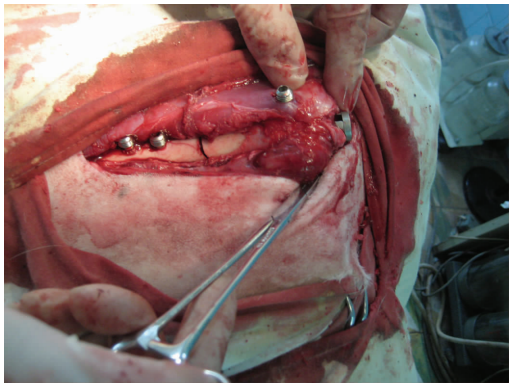


图 4 青山羊左侧股骨干中段横断骨折 ACLN 固定模型

1.3 试剂

DEPC 购于罗氏公司,Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒和 SYBRGreen 购于 Toyobo 公司,Trizol 和 2×PCR MIX *Taq* 购于北京天根公司,PCR System 7500 购于 Applied Biosy Stems,小鼠 Osteocalcin 单克隆一抗、小鼠 Collagen Ⅰ(COL-Ⅰ)单克隆一抗、羊抗小鼠二抗购于北京中杉生物技术有限公司。PCR 引物序列:COL-Ⅰ(126 bp)上游:5′-TCAAATCAACAGAAAATATAC-3′,COL-Ⅰ 下游:5′-CCCCCACAAAGGCATCGGTATT-3′,Osteocalcin(159 bp)上游:5′-GCGCTACCTGTATCAATGGCTGG-3′;Osteocalcin 下游:5′-GCCTCCTGAAAGCCGATGTGGTC-3′;以 β-actin(249 bp)作内参,上游:5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游:5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′。

1.4 组织病理学观察

标本置于 10% 甲醛溶液中固定。Plank 和 Rycho 脱钙液(配方组成:氯化铝结晶 7 g,浓盐酸 8.5 ml,95% 甲酸 5 ml,蒸馏水 100 ml)脱钙 24 h,置水中冲洗 16 h,乙醇脱水,二甲苯透

明,石蜡包埋,Leitz 1512 型切片机顺羊股骨纵轴切片,片厚 6 μm,先取 2 片,切入 300 μm 后再取 2 片,HE 染色,中性树胶封片,在光镜下作组织学观察。

1.5 RT-PCR 分析

每只实验羊取 50 mg 标本在液氮中迅速研磨成粉末状,加 1 ml Trizol,冰上裂解 20 min,加氯仿分离,水相层经异丙醇沉淀,RNA 产物溶于 DEPC 40 μl 水中,-70 ℃保存待用。取总 RNA 1 μg。按试剂盒要求配制成反转录反应液 10 μl,65 ℃水浴 1 min,30 ℃放置 5 min,65 ℃孵育 15 min,98 ℃灭活逆转录酶 5 min,低温保存。配制 40 μl PCR 反应液,含 2 × PCR Mix *Taq* 0.25 μl 及上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl。分别取 10 μl 反转录产物加入 2 对引物的 PCR 反应液中:94 ℃ 30 s,退火 30 s,72 ℃扩增 1 min。COL-Ⅰ、Osteocalcin 和 β-actin 基因分别循环 30、35、30 次,退火温度分别为 63、58、58 ℃,终末延伸产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Quantity One 软件计算目的基因比同组 β-actin 的相对灰度值。

1.6 Western blot 检测

从液氮中取出实验羊骨痂迅速研磨成粉末状,加入裂解液,轻微振荡混匀;冰浴 30 min;将匀浆液吸入 1.5 ml 离心管中,置冰上裂解 60 min;4 ℃,13 000 r/min,离心 15 min;取上清,重复上述步骤 1 次;取少量测浓度,其余分装,-70 ℃冻存备用,避免反复冻融。取上清 50 μg 进行 SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜上。适量脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,小鼠 Osteocalcin 单克隆一抗和小鼠 Collagen Ⅰ单克隆一抗 4 ℃孵育 1 ~ 2 h,TBST 洗涤 3 次,10 min/次。同法加入二抗,室温下孵育 1 ~ 2 h,用在室温下脱色摇床上洗涤 2 次,10 min/次,再用 TBST 洗涤 1 次,10 min。将 PVDF 膜置于暗盒中,X 线曝光,显影定影。紫外分光光度仪于 562 nm 波长测定光密度,采用 Bandscan 5.0 软件计算光密度值。

1.7 统计学分析

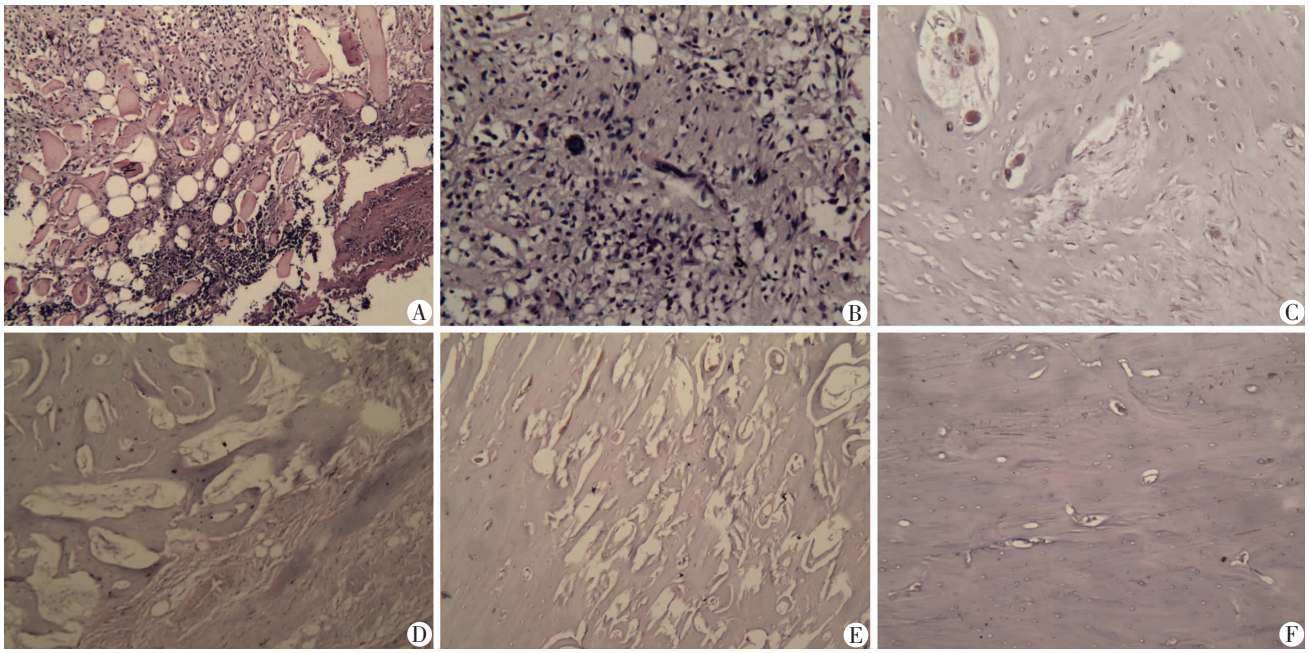
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件行配对 t 检验。

2 结果

术后实验羊全部存活,伤口无感染,双侧患肢活动良好,无明显血管、神经损害表现。术后 X 线片显示骨折复位良好,内固定在位。

2.1 组织病理学观察

骨折术后 7 d,2 组骨折断端及周围软组织内均呈血肿机化后的纤维肉芽组织结构,新生血管数目增多,纤维母细胞及肌纤维母细胞增生活跃,炎性坏死组织中可见点状钙化。术后 14 d,2 组骨折断端及周围软组织内软骨痂也渐形成,软骨基质 HE 染色呈深蓝色,片块状或巢状分布,未成熟的软骨细胞体积较小,成熟的明显肥大。与对照组相比,动态加压实验组软骨痂的部分区域已经出现软骨内骨化现象,片块状软骨基质内侧及巢状分布软骨基质周缘可见灶性钙化及类骨质形成,部分形成灶性初期骨小梁,骨小梁中央的钙化软骨基质偏蓝,而周围是偏红的骨组织。对照组骨折间隙内虽然也有软骨内骨化,但大部分仍处于软骨痂的成熟阶段,见图 5A、B。术后 1 个月,2 组骨折间隙内均为编织骨痂成分,骨小梁排列方向不规则,表面分布着较多成骨细胞。实验组骨小梁中央部位未见钙化的软骨基质结构,见图 5C、D。术后 2、3 个月,2 组骨折端均为相对完全的骨性结构,实验组基本为板层骨,骨板沿骨纵轴方向排列,并可见哈佛管结构。相对而言,对照组板层骨排列方向较紊乱,细胞数量也较多,见图 5E、F。

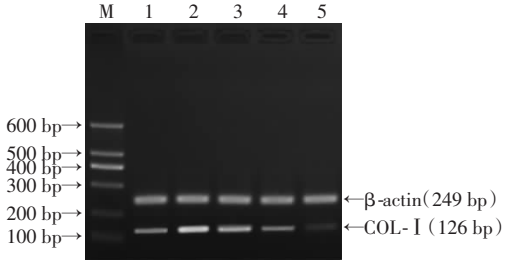


A、C、E:实验组术后 14、30、90 d;B、D、F:对照组术后 14、30、90 d

图 5 骨折术后 2 组实验羊组织病理学观察 (HE ×200)

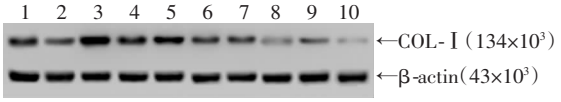
2.2 COL-Ⅰ和 Osteocalcin mRNA 及蛋白表达

2.2.1 COL-Ⅰ mRNA 及蛋白表达 实验组和对照组 COL-Ⅰ mRNA 的表达于术后表现出上升趋势，并于 14 d 达到峰值，然后逐步下降，在 90 d 时几近于术后初期水平。实验组术后 14 d 的表达峰值与对照组存在显著性差异（$P<0.05$）。见图 6，表 1。COL-Ⅰ蛋白表达趋势与 mRNA 一致，实验组的峰值蛋白表达较对照组上调了 1.7 倍（图 7、表 1）。



M：标准；1：7 d；2：14 d；3：30 d；4：60 d；5：90 d

图 6 RT-PCR 检测实验组骨折术后不同时相点 COL-Ⅰ mRNA 表达



1、3、5、7、9：分别为实验组 7、14、30、60、90 d；2、4、6、8、10：分别为对照组 7、14、30、60、90 d

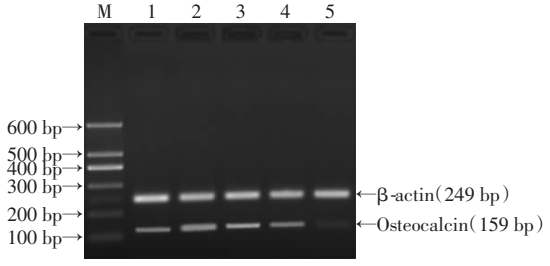
图 7 Western blot 检测 2 组骨痂 COL-Ⅰ蛋白表达

表 1 2 组实验羊骨折术后不同时相点 COL-Ⅰ mRNA 及蛋白表达（$n=3, \bar{x}\pm s$）

时相点	COL-Ⅰ mRNA 表达		COL-Ⅰ蛋白表达	
	对照组	实验组	对照组	实验组
7 d	11.5±0.4	12.4±0.3	31.5±1.1	47.8±3.2
14 d	33.6±1.9	48.4±3.8[a]	43.8±1.2	74.7±4.3[a]
30 d	29.3±2.5	36.2±2.4	38.7±2.5	68.9±3.1
60 d	16.7±2.4	27.3±3.7	20.4±1.2	39.7±3.1
90 d	10.9±2.0	10.6±2.3	14.6±1.0	28.8±1.0

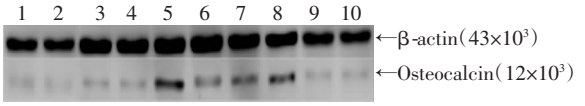
a：$P<0.05$，与同时相点对照组比较

2.2.2 Osteocalcin mRNA 及蛋白表达 Osteocalcin mRNA 的前期表达与 COL-Ⅰ相似，实验组和对照组在术后亦表现出上升趋势，但其峰值出现在术后 30 d，较 COL-Ⅰ晚 2 周左右时间，并且在峰值后出现的降幅较 COL-Ⅰ大，术后 90 d 2 组 mRNA 几近回落至术后 7 d 水平，未见组间差异（$P>0.05$）。实验组在术后 30 d 的表达与对照组差异存在显著性（$P<0.05$）。见图 8，表 2。Osteocalcin 的蛋白表达也表现出相同的变化趋势，实验组峰值较对照组的表达上调了 2 倍（图 9、表 2）。



M：标准；1：7 d；2：14 d；3：30 d；4：60 d；5：90 d

图 8 RT-PCR 检测实验组骨折术后不同时相点 Osteocalcin mRNA 表达



1、3、5、7、9：分别为实验组 7、14、30、60、90 d；2、4、6、8、10：分别为对照组 7、14、30、60、90 d

图 9 Western blot 检测 2 组骨痂 Osteocalcin 蛋白表达

表 2 2 组实验羊骨折术后不同时相点 Osteocalcin mRNA 及蛋白表达（$n=3, \bar{x}\pm s$）

时相点	Osteocalcin mRNA 表达		Osteocalcin 蛋白表达	
	对照组	实验组	对照组	实验组
7 d	20.3±4.1	17.2±4.3	5.3±1.7	5.9±1.5
14 d	23.3±4.9	21.9±5.1	9.8±2.3	10.6±2.2
30 d	28.7±8.9	41.4±9.9[a]	14.3±3.6	28.9±4.1[a]
60 d	22.4±3.9	19.7±5.7	23.1±3.3	15.5±3.1
90 d	20.2±3.4	9.3±4.3	8.8±2.1	9.2±1.8

a：$P<0.05$，与同时相点对照组比较

3 讨论

应力是细胞分子调控的刺激因子，是影响细胞结构和功能的重要外界信息。研究表明，骨折愈合对力学的刺激很敏感，骨组织对生理水平的应力载荷有 3 种相应的反馈：①由于骨细胞的活力增加而产生的骨密度增加。②由于哈佛体系的活力和松质骨中的成骨细胞和破骨细胞引起的骨结构变化。③骨膜厚度增加[3-4]。本研究采用的动态加压交锁髓内针能够在稳定固定的基础上，在骨折两端产生持续性的轴向压应力，增加成骨细胞和骨细胞等的代谢活性，刺激分泌细胞外基质的合成与释放，能够有效驱动软骨痂的钙化和间充质干细胞向成骨方向分化，刺激成骨细胞活性，并促进编织骨痂向板层骨的改建。

本研究采用轴向压应力和微动能够促进骨折愈合的理论，通过自动加压交锁髓内针实现在骨折局部产生应力加载、应力形变和轴向微动应力传导的生物力学环境，对成骨效应细胞进行调控。骨折断端间的轴向微动压应力能够刺激成骨细胞活性，实验组组织学观察证实，早期和中期的骨痂数量多、中期和后期的骨痂质量好，成熟程度高骨小梁坚韧，哈佛系统结构也较完整。

成骨细胞作为骨组织中唯一的具有成骨功能的细胞，对骨的构建和修复起到重要作用。成骨细胞的生长分化和基因表达一般经历以下几个节段：①分化增殖期，以 DNA 复制，组蛋白合成为其特征；②基质形成、成熟期，以碱性磷酸酶（ALP）活性升高、COL-Ⅰ分泌为其特征；③基质钙化期，以 Osteocalcin 分泌、钙离

子沉积为其特征,并伴有 ALP 活性的持续升高。因此,COL-Ⅰ和 Osteocalcin 均为成骨细胞不同生长阶段的特异性表型蛋白,其表达量分别反映了成骨细胞基质合成与钙化的能力[5-6]。COL-Ⅰ在骨组织的形成过程中有着十分重要的作用,占骨基质的90%以上,形成胶原网基质结构,与其他蛋白质结合,为羟基磷灰石的沉积提供沉着点。如其表达出现异常,则会引发成骨不全、骨-软骨发育不良症与青少年型骨质疏松症。本实验中骨折修复均为二期愈合,显然实验组软骨痂基质的钙化和软骨内成骨较对照组明显提前,在愈合后期的板层骨痂结构也相对成熟。在术后7~14 d,实验组和对照组 COL-Ⅰ mRNA 和蛋白表达量急剧增高,这与骨组织的软骨内成骨时间一致。2组此时相点组间比较,峰值差异有统计学意义($P<0.05$)。说明在持续性轴向压应力作用下,骨折间隙内的成骨细胞合成、分泌细胞外基质活性得到明显增强。

Osteocalcin 是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白,是反映成骨细胞分化成熟的指标,能够准确表示成骨细胞的基质钙化活性,一般较 ALP 和 COL-Ⅰ出现晚。当骨形成和骨吸收偶联时,Osteocalcin 的主要生理作用是反映骨转换的指标,而在骨形成和骨吸收解除偶联时,又是反映骨形成的特异指标,能够准确反映成骨细胞的成骨能力。本实验2组 Osteocalcin 表达均在术后开始增高,并于术后30 d出现峰值,而后迅速下降,这与骨修复后期的骨痂改建密切相关[7]。新近研究表明,Osteocalcin 可能还是一种应激反应神经肽,在应激状态下,可被释放入血循环,并作为骨组织的生物标记随应激的类型发生变化,介导应激反应[8]。在动态加压交锁髓内针的固定加压作用下,实验组在术后14~30 d,Osteocalcin mRNA 和蛋白的表达量均高于对照组,并且30 d峰值存在显著性差异($P<0.05$)。说明在持续性轴向压应力生物力学环境下,骨折间隙内的软骨内成骨和编织骨痂的形成活跃,成骨细胞的活性也更旺盛。

目前,有关生物力学促进成骨细胞增殖的效应已得到了实验证实[9-10],但对于轴向压应力对细胞外基质合成分泌影响的报道较少,由于内固定器械本身设计动态加压的难度和在体研究的复杂性,因此这方面的报道就显得更为稀少。本研究通过有限元分析明确设计的自动加压交锁髓内针对骨折断端有加压作用,其产生的动态轴向压应力能够有效地刺激成骨细胞外基质的合成分泌,从而促进骨折愈合。然而对于力学加载的确切细胞学机制和分子生物学机制仍不甚清楚。间充质干细胞、成骨细胞和破骨细胞等如何感受机械刺激并将其传递到细胞内引发细胞的生理变化,以及对细胞力学转导过程还需要做大量更为深入地探索。

参考文献:

[1] Gomez-Benito M J, Gonzalez-Torres L A, Reina-Romo E, *et al*. Influence of high-frequency cyclical stimulation on the bone fracture-healing process: mathematical and experimental models[J]. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2011, 369(1954): 4278-4294.

[2] Knothe U R, Dolejs S, Matthew Miller R, *et al*. Effects of mechanical loading patterns, bone graft, and proximity to periosteum on bone defect healing[J]. J Biomech, 2010, 43(14): 2728-2737.

[3] Saxon L K, Lanyon L E. Assessment of the *in vivo* adaptive response to mechanical loading[J]. Methods Mol Biol, 2008, 455: 307-322.

[4] Tang L, Wang Y, Gu L, *et al*. Responses of osteoblasts to cyclic stretching and the change of intracellular calcium concentration[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(4): 346-350.

[5] Sun X, McLamore E, Kishore V, *et al*. Mechanical stretch induced calcium efflux from bone matrix stimulates osteoblasts[J]. Bone, 2012, 50(3): 581-591.

[6] Cho T J, Gerstenfeld L C, Einhorn T A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(3): 513-520.

[7] Hu Z, Peel S A, Ho S K, *et al*. Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation[J]. J Craniofac Surg, 2005, 16(6): 1006-1014.

[8] Patterson-Buckendahl P. Osteocalcin is a stress-responsive neuropeptide[J]. Endocr Regul, 2011, 45(2): 99-110.

[9] Pitsillides A A, Rawlinson S C. Using cell and organ culture models to analyze responses of bone cells to mechanical stimulation[J]. Methods Mol Biol, 2012, 816: 593-619.

[10] Moustafa A, Sugiyama T, Prasad J, *et al*. Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered[J]. Osteoporos Int, 2012, 23(4): 1225-1234.

(**收稿**:2012-05-24;**修回**:2012-06-13)

(编辑 龙 亮)